

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor : Prof. Dr. W. Kersten

t-RNA-METHYLTRANSFERASEN AUS E. COLI

Untersuchungen an methyltransferase-aktiven
Proteinfractionen aus E. coli unter Anwendung
chromatographischer, elektrophoretischer
und immunologischer Methoden

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Hohen Fachbereichs Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Ekkehard Ziemer

aus Berlin-Lichterfelde

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut
der Universität Erlangen - Nürnberg

Direktor : Prof. Dr. W. Kersten

t-RNA-METHYLTRANSFERASEN AUS E. COLI

Untersuchungen an methyltransferase-aktiven
Proteinfraktionen aus E. coli unter Anwendung
chromatographischer, elektrophoretischer
und immunologischer Methoden

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
des Hohen Fachbereichs Medizin
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt von

Ekkehard Ziemer

aus Berlin-Lichterfelde

Gedruckt mit Erlaubnis des Fachbereichs Medizin der
Universität Erlangen-Nürnberg



komm. Dekan: Prof. Dr. E. Rügheimer

Referent: Prof. Dr. W. Kersten

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Januar 1975

Meinen Eltern gewidmet
in Dankbarkeit

Inhaltsverzeichnis

	<u>Seite</u>
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Material und Methoden	2
2.1 Bakterienzucht, -aufschluß und Präparation enzymatisch aktiver Proteinfraktionen	2
2.2 Auftrennung der "Fraktion A" an Celluloseionenenaustauscher in linearem Sörensenphosphat-Gradienten	4
2.2.1 Entsalzung der Proteine	4
2.2.2 Säulenchromatographie an DEAE- Cellulose	5
2.3 Präparative Disk-Elektrophorese eines nach 2.2 vorgetrennten Anteils	6
2.4 Proteinbestimmungen	8
2.4.1 Flankenmessung bei 215,5 - 225 nm	8
2.4.2 Methode nach BIURET	8
2.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von tRNA-Methyltransferasen	9
2.6 Analytische Disk-Elektrophorese an Polyacrylamidzylindergelen	11
2.7 Immunologische Methoden	12
2.7.1 Gewinnung multivalenter Antisera	12
2.7.2 Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS Mikromethode nach SCHEIDEGGER	13
2.7.3 "Rocket-Immunelektrophorese"	14
2.7.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivi- tät von Methyltransferasen aus Pro- teinfraktion B unter dem Einfluß korrespondierender multivalenter Anti- sera	15

	<u>Seite</u>
3.	Ergebnisse 16
3.1	Zerlegung der Proteinfraktion A in 12 enzymatisch aktive Subfraktionen und ihre Charakterisierung 16
3.2	Präparative Disk-Elektrophorese von Subfraktion 7 23
3.3	Der Einfluß multivalenter Antiseren gegen Proteinfraktion B auf korrespondierende tRNA-Methyltransferasen 33
3.3.1	Bestimmung der Methylierung von tRNA in Anwesenheit des Antiserums 34
3.3.2	Bestimmung der tRNA-Methylierung nach Vorinkubation der Enzyme mit dem korrespondierenden Antiserum 39
3.3.3	Bestimmung der Methylierung in Anwesenheit des Antiserums in hohem Überschuß 42
3.3.4	Bestimmung der tRNA-Methylierung nach Vorinkubation der Enzyme mit dem korrespondierenden Antiserum in hohem Überschuß 46
3.3.5	Untersuchungen des Substratschutzes 47
4.	Diskussion 50
5.	Zusammenfassung 54
6.	Literaturverzeichnis 56

1. Einleitung und Problemstellung

Untersuchungen an transfer-Ribonucleinsäuren (tRNA), den Transport-Molekülen von Aminosäuren der Proteinbiosynthese, haben das Interesse auf eine besondere Gruppe von Enzymen aus der Klasse der Transferasen gelenkt. Dieses sind die tRNA-Methyltransferasen (1, 2). Sie modifizieren die tRNAs, indem sie zahlreiche Nucleoside an Stickstoff, Kohlenstoff und Sauerstoff methylieren. Methylgruppen-Donator und somit Co-Substrat der enzymatischen Reaktion in der Zelle ist das hochenergetische S-Adenosylmethionin (SAM).

Die Methylierung der Nucleoside findet nach abgeschlossener Synthese zum Polynucleotid statt (3,4). Die verantwortlichen Enzyme konnten sowohl im Cytoplasma (5,6,7) als auch im Zellkern (8) nachgewiesen werden. SRINIVASAN u. BOREK (9) sowie TURKINGTON u. RIDDLE (10) zeigten, daß tRNA-Methyltransferasen basenspezifisch, speziesspezifisch und organspezifisch sind. Darüber hinaus scheinen auch Anzeichen gegeben, daß die Enzymspezifität von einer Teilsequenz der jeweiligen tRNA abhängig ist (11,12,13).

Nachdem erstmalig 1962 tRNA-Methyltransferasen in Extrakten von *Escherichia coli* nachgewiesen werden konnten (3), sind von zahlreichen Arbeitsgruppen Proteinfraktionen mit Methyltransferaseaktivität aus den verschiedensten Organismen angereichert worden (6,12,14,15,16). Reine Enzyme konnten jedoch bis heute nicht dargestellt werden.

In umfangreichen Untersuchungen hat HURWITZ 1964 (15,17) sechs aktive Proteinfraktionen aus *E. coli* W isoliert, die untermethylierte tRNA basenspezi-

fisch methylierten. Anknüpfend an diese Experimente sind von der Arbeitsgruppe, unter deren Anleitung die vorliegende Arbeit erstellt wurde, methyltransferase-aktive Proteinfraktionen aus E. coli MRE 600 angereichert worden.

Dieser Präparationsgang der Anreicherung wird beschrieben unter besonderer Berücksichtigung:

1. Der Untersuchung analytischer und präparativer Trenneigenschaften der von ORNSTEIN u. DAVIS (1964 (18,19) entwickelten diskontinuierlichen Polyacrylamidgel-Elektrophorese.
2. Der immunchemischen Reinheitskontrolle getrennter Proteinfraktionen mit Hilfe der Immunelektrophorese nach GRABAR u. WILLIAMS (20), Mikromethode nach SCHEIDEGGER (21) sowie der "Rocket-Immunelektrophorese" nach LAURELL (22).
3. Der Ermittlung des Verhaltens von tRNA-Methyltransferasen gegenüber ihren korrespondierenden Antikörpern in multivalenten Kaninchen-Antiseren.

2. Material und Methoden

2.1 Bakterienzucht*, Bakterienaufschluß* und Präparation enzymatisch aktiver Proteinfraktionen.

E. coli MRE 600 wurde mit 100 l-Fermenter (60 l Minimalmedium) bei Boehringer/Tutzing gezüchtet, zu Ende

* Für Bakterienzucht und Hochdruckdispersionsaufschluß sei der Fa. Boehringer/Tutzing vielmals gedankt.

der logarithmischen Wachstumsphase abzentrifugiert (CEPA-Durchlaufzentrifuge, Fa. Padberg/Lahr) und sofort auf -18°C tiefgefroren.

500 g-Chargen (Feuchtgewicht) wurden folgendermaßen weiterverarbeitet: Unter Verwendung eines Turborührers bereitet man mit 2,5 Liter 0,01 M Tris/HCl-Puffer pH 7,5; 10^{-2}M an Mg Cl_2 eine homogene Bakterienschlempe von 0°C .

Der anschließende Aufschluß dieser Masse erfolgt durch Hochdruckdispergierung bei 500 at Druck (Dispergator: Manton-Gaulin Manuf.Co.Inc., Everett, Mass.). Die Passagedauer durch die Maschine beträgt 2 Minuten. Zur Erzielung eines optimalen Aufschlusses wird zweimal passiert; auftretende Temperaturschwankungen zwischen 1°C bei Passagebeginn und 13°C bei Passageende werden durch Abkühlen in Eis/Aceton ausgeglichen. Nach Zentrifugation über 90 min bei $13.000 \times g$ (Sorvall) erhält man im Überstand 4000 ml leicht opaleszenten Rohextrakt, aus dem unter Zusatz von 2700 ml 0,5 %iger wässriger Protaminsulfatlösung die Nucleinsäuren ausgefällt werden (15). Zentrifugation bei $3.000 \times g$ (Beckman, Mistral 6 B) über 30 min erbringt einen klaren Überstand. Die hierin enthaltenen Proteine werden bei Sättigung mit Ammoniumsulfat ausgefällt und bilden die Fraktion A, die bis zur portionsweisen Weiterverarbeitung bei 0°C gelagert wird.

Das verbliebene Pellet extrahiert man mit 2300 ml Succinatpuffer pH 6,0 unter Homogenisierung mittels Turborührer über 30 Minuten und zentrifugiert letztlich bei $3.000 \times g$ über 45 Minuten. Der klare, farblose Überstand wird ebenfalls mit Ammoniumsulfat gesättigt und bei 0°C aufgehoben (Fraktion B).

2.2 Auftrennung der "Fraktion A" an Celluloseionenaustauscher in linearem Sörensenphosphat-Gradienten.

2.2.1 Entsalzung der Proteine

Ca. 300 ml der abdekantierten Proteinsuspension in gesättigtem Ammoniumsulfat werden bei 18.000 x g und 0° C abzentrifugiert (Sorvall) und in ca. 100 ml 0,05 M Triäthanolamin-Puffer (TAA) pH 8,8 aufgenommen. Die gelbe Lösung wird anschließend an mit gleichem Puffer äquilibriertem Sephadex G-25 (Pharmacia/Uppsala) säulenchromatographisch entsalzt (Abb. 1).

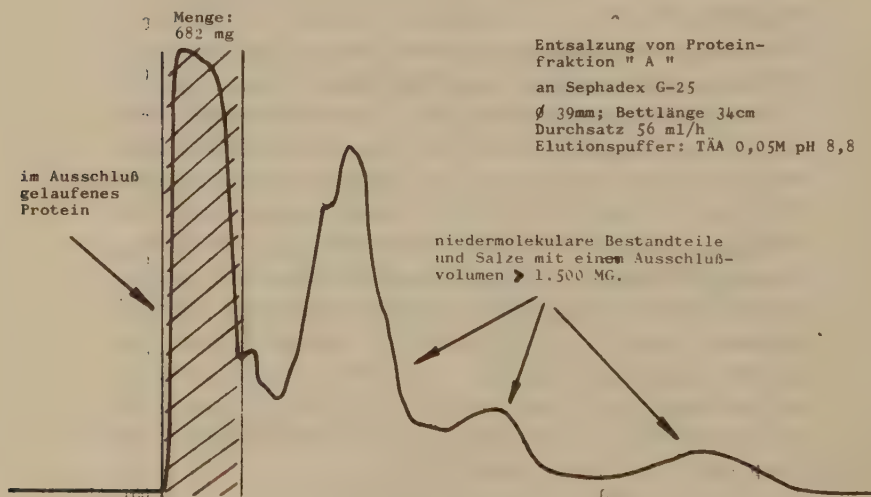


Abb. 1: Entsalzung von Fraktion A an Sephadex G-25. Temperierung 0° C; Elutionskontrolle: registrierendes Durchflußphotometer Uvicord II (LKB-Produkte/Stockholm). Säule: Ø 39 mm; Länge: 34 cm; Durchsatz: 56 ml/h.

Der erste Gipfel (Ausschlußvolumen) wird separiert und sein Proteingehalt über Flankenmessung bei 215,5 und 225 nm gegen reinen Elutionspuffer bestimmt (s. 2.4).

2.2.2 Säulenchromatographie an DEAE-Cellulose

Die eiskalte, salzfreie Lösung der methyltransferase-aktiven Proteine wird auf eine sorgfältig mit 0,05 M TAA-Puffer äquilibrierte DEAE-Säule (Whatman DE 32, Hormuth & Vetter/Heidelberg) von 400 mm Länge und 40 mm Durchmesser aufgegeben. Das klare, leicht gelb gefärbte Proteingemisch bindet, optisch gut sichtbar, in 10 bis 15 mm starker Schicht total an den Austauscher.

Nach Auftrag der Probe wird wie folgt eluiert:

1. Nachwaschen mit TAA-Puffer über 1 Stunde.
2. Sörensenphosphat-Puffergradient von 0,01 M - 0,1 M über 48 Stunden.
3. Sörensenphosphat-Puffergradient von 0,1 M bis 0,2 M über 24 Stunden.
4. Sörensenphosphat-Puffer konstant 0,5 M über 12 Stunden.

Alle Sörensenphosphat-Puffer besitzen einen pH von 6,5. Die einzelnen Elutionsgradienten werden über einen Gradientenmischer (Ultrograd, LKB-Produkte/Stockholm) hergestellt.

Die eluierten Proteinmengen registriert man durchflußspektrographisch synchron mit der Leitfähigkeit des Gradienten auf einem Meßstreifen (Uvicord II, Conductolyzer, 6-Kanalschreiber) und sammelt sie in einem Fraktionssammler (Ultrorac). Hersteller der genannten Geräte ist die Fa. LKB-Produkte/Stockholm. Der Säulendurchsatz beträgt ca. 24 ml/h.

Es werden Partialvolumen von 12 ml (= 30 min-Fraktionsfolge) geschnitten, die zur Stabilisierung der Enzymaktivität in 6 ml vorgelegte 0,5 %ige Hefe-RNA (Boehringer) in 0,05 M Tris/HCl-Puffer von pH 8,8 eintropfen (23).

Nach abgeschlossener Trennung werden diese Partialvolumen zu 12 Hauptfraktionen zusammengefaßt.

2.3 Präparative Disk-Elektrophorese eines nach 2.2 vorgetrennten Anteils

Für diese Trennungsmethode verwendet man das Polyacrylamidgel-System Nr. 1 a nach MAURER (24) in einer Plattengel-Elektrophoreseapparatur (Ultraphor, Colora/Lorch) mit einer Trennkammer von 150 x 190 x 6 mm. An der Unterseite des Gels befindet sich ein besonders gestaltetes Elutionskammer-System, in dem die austretenden Proteinbanden vom Elutionspufferstrom erfaßt und ausgespült werden. Die eluierten Proteinanteile registriert man durch ein nachgeschaltetes Durchflußspektrometer (Uvicord II), aufgefangen werden sie in einem Fraktionssammler (Ultrorac).

Gelsystem: Sammelgel 3,1 %ig; pH 6,7; 45 mm hoch
Trenngel 5,6 %ig; pH 8,9; 115 mm hoch

Lösungen:

A = 1 N HCl	48 ml
Tris	36,6 g/100 ml H ₂ O pH 8,9
Temed	0,23 ml
B = 1 N HCl	48 ml
Tris	5,98 g/100 ml H ₂ O pH 6,7
Temed	0,46 ml
C = Acrylamid	28,0 g
Bisacrylamid	0,735 g 100 ml H ₂ O

D = Acrylamid 10,0 g
Bisacrylamid 2,5 g / 100 ml H₂O
E = Riboflavin 4 mg / 100 ml H₂O
AP = Ammonpersulfat 140 mg / 100 ml H₂O

Gelzusammensetzung:

SG = 1 : 2 : 3 : 1 = B : D : H₂O : E

TG₄ = 1 : 2 : 3 : 4 = A : C : H₂O : AP

Puffer:

1. Kammer 0,34 M Tris/Glycin-Puffer pH 8,3
2. Gegenkammer 0,36 M Tris/HCl -Puffer pH 8,1
3. Elutions 0,12 M Tris/HCl -Puffer pH 8,1

Elutionspufferdurchsatz: 49,5 ml/h

Gegenkammerpufferdurchsatz: 12 ml/h

Vorbereitung und Auftrag der Proteinprobe:

150 ml der betreffenden Proteinlösung werden mit Ammoniumsulfat bis zur Sättigung versetzt, das ausgefallene Eiweiß/RNA-Addukt bei 18.000 x g/0° C über 20 min zentrifugiert, in wenig kaltem 0,05 M TAA-Puffer von pH 8,8 aufgenommen und über eine kleine, 0° C temperierte und mit vorgenanntem Puffer äquilibrierte Sephadex G-25 Säule (l = 150 mm; Ø = 16 mm) entsalzt. Man erhält so ca. 7 ml ammoniumsulfatfreie, konzentrierte Protein/RNA-Lösung, der man zur Erhöhung ihrer Dichte 2,1 g Glucose zufügt. Die so beschwerte Probenlösung wird über eine Kolbenspritze mit langer Kanüle in die zur Elektrophorese bereite, vollständig gefüllte Apparatur auf die Geloberfläche geschichtet.

Elektrophorese:

Die Stromstärke beträgt zunächst 50 mA bis zum vollständigen Eindringen der Probe in das Sammelgel, dann 75 mA. Nach ca. 4 Stunden ist die, auch ohne Indikator, gut sichtbare Pufferfront in das Trenngel eingewandert; die Elektrophorese verläuft dann konstant bei 90 mA bis zum Abschluß der Trennung. Bei einer Elektrophoresetemperatur von 0°- 1° C steigt die Spannung bei 300 Volt zu Beginn bis 600 Volt gegen Ende der Trennung an.

2.4 Proteinbestimmung

2.4.1 Flankenmessung bei 215,5 - 225 nm

Hier wird die beginnende Absorption der NH-Bande im genannten Spektralgebiet zur quantitativen Bestimmung der Proteine herangezogen (25). Als Bezugssubstanz diente uns elektrophoretisch reines Rinderserumalbumin (Behringwerke/Marburg). Meßgerät PMQ II (Zeiss).

2.4.2 Methode nach BIURET

Diese Bestimmungsmethode (26) wurde bei RNA-haltigen Proteinlösungen (siehe 2.2 und 2.3) angewendet (Abb. 2). Als Bezugssubstanz diente wiederum Rinderserumalbumin (Behringwerke/Marburg).

Spezielle Anmerkung zur Methode:

Gehaltsbestimmungen von Proteinfraktionen aus präparativen disk-elektrophoretischen Trennungen werden durch niedermolekulares Polyacrylamid gestört, das in nennenswerten Mengen kontinuierlich aus dem Gel ausgespült wird. In einem präparativen "Leerlauf" einer Disk-Elektrophorese nach 2.3 ermittelte man über die BIURET-Methode den Polyacrylamidgehalt pro Fraktion und korrigierte anschließend aus Trennung erhaltene Proteinkonzentrationen um diesen "Scheinwert".

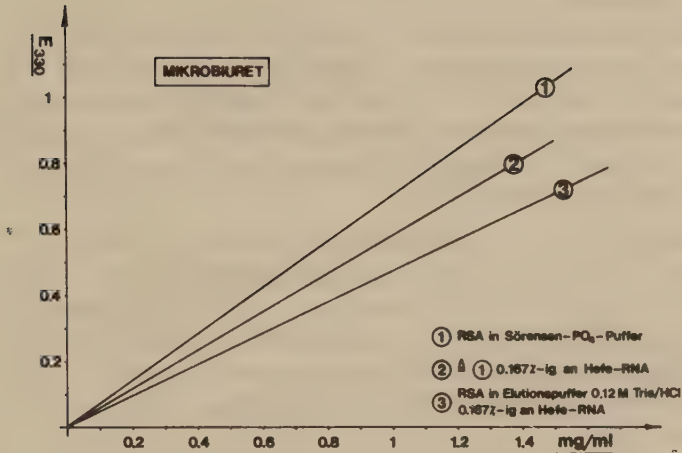


Abb. 2: Eichkurve zur Proteinbestimmung nach BIURET

2.5 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Methyltransferasen

Methode:

Der Einbau radioaktiv markierter Methylgruppen in untermethylierte transfer-Ribonucleinsäuren im homologen System wird mit Hilfe von Scintillationszählungen bestimmt (13,15,27). Als Methylgruppendonator (Co-Substrat) der enzymatischen Reaktion dient ein Gemisch aus ^{12}C - und ^{14}C -S-Adenosylmethionin (SAM). Die Enzymaktivität wird bei Substratüberschuß ermittelt und entsprechend der gemessenen Radioaktivität (in counts per minute, cpm) angegeben. In Leerproben ohne Substrat wird die unspezifische Adsorption von radioaktivem SAM durch eingebrachtes Enzymprotein ebenso bestimmt.

Material:

Angereicherte Enzymproteine aus E. coli MRE 600.
tRNA met⁻ als Substrat, präpariert nach (28, 35)
aus E. coli K 12-58-161 F⁻, methionin⁻, (Borek-strain).
S-Adenosylmethionin ¹⁴C-markiert (Radiochemical Center,
Amersham) 55 mCi/mMol; S-Adenosylmethionin unmarkiert
(Boehringer, Mannheim)

TMMg-Puffer: 0,1 M TAA-Puffer pH 8,0

0,02 M an Mercaptoäthanol

0,01 M an MgCl₂

0,05 M Tris/HCl-Puffer pH 8,0 (für Leerwert)

Trichloressigsäure (TCA): 5 %ig und 10 %ig

"Waschflüssigkeit" - Äthanol: Eisessig: NaOH =
2300:120:1,6

Äther

Toluolscintillator: 5 g PPO + 0,3 g Dimethyl-POPOP pro
1 Liter Toluol (FPO : 2,5-Diphenyloxazole; Dimethyl-
POPOP: 1,4-bis-2-(4-Methyl-5-Phenyloxazolyl)-Benzol,
Packard Instruments GmbH/Frankfurt)

Whatman 3-MM-Filterplättchen Ø = 2,3 cm (Hormuth &
Vetter/Heidelberg)

Scintillationszähler (Packard Tri-Carb Liquid Scintil-
lation Spectrometer, Modell 3003; Packard Instruments
GmbH/Frankfurt).

Testansatz:

A: 0,22 ml Standardansatz für Fraktion A-Proteine

20 ul SAM (spez. Akt: 10,8 mCi/mMol)

50 ul tRNA met⁻ (= 2 OD 260 Substrat)

50 ul TMMg-Puffer

100 ul methyltransferaseaktive Proteinlösung

B: 0,16 ml Standardansatz für Fraktion B-Proteine
10 ul SAM (spez. Akt: 3,125 mCi/mMol)
50 ul tRNA met⁻ (= 2 OD₂₆₀ Substrat)
50 ul TMMg-Puffer
50 ul methyltransferaseaktive Proteinlösung

Testablauf:

Die Proben werden im Wasserbad über 2 h bei 37° C inkubiert. Danach stoppt man die enzymatische Reaktion durch Abkühlen auf 0° C, pipettiert 100 ul des Ansatzes auf ein Filterblättchen (Whatman 3 MM Ø 2,3 cm) und trocknet unter heißem Fön über 20 Sekunden. Die Filter werden anschließend in 10 %iger TCA über 30 min fixiert und folgendermaßen gewaschen:

3 x mit 5 %iger TCA über jeweils 5 min,
1 x mit "Waschflüssigkeit" über 5 min,
1 x mit Äther über 5 min.

Alle Waschlösungen werden eisgekühlt verwendet.

Nach Trocknung über 60 - 90 min bei 60° C im Trockenschrank werden die Plättchen zusammen mit 10 ml Toluol-scintillator in Gläschen gegeben und der Einbau der radioaktiv markierten Methylgruppen im Scintillationszähler bestimmt.

2.6 Analytische Disk-Elektrophorese an Polyacrylamid-zylindergelen

Material:

Glasröhrchen: 6 x 150 mm

Gelsystem wie unter 2.3

Sammelgel (SG): 3,1 %ig; pH = 6,7; 45 mm hoch

Trenngel (TG): 5,6 %ig; pH = 8,9; 70 mm hoch

Laufstrecke: 100 mm (= 45 mm im SG + 55 mm im TG)

Elektrophoresepuffer: 48 ml 1 N HCl

36,3 g Tris

Temed 0,23 ml

ad 100 ml

Zusatz von 2 Tropfen 1 %iger Bromphenolrotlösung zur Markierung der Pufferfront.

Elektrophorese:

Polymerisation erfolgt in einseitig verschlossenen Glasröhrchen. Die mit 30 % Glucose beschwerte Probenlösung (70 - 90 ug pro Röhrchen) wird per Kolbenspritze auf die pufferüberschichtete Gelsäule aufgetragen.

Stromstärken: 0,5 mA/Gelzylinder beim Start;

1,0 mA/Gelzylinder, wenn Probe im SG;

2,5 mA/Gelzylinder, wenn Probe im TG.

Ende der Elektrophorese, wenn die erste Bande die 100 mm-Marke erreicht hat (ca. 4 - 6 h).

Proteinfärbung: 0,5 % Amidoschwarz 10B in 7 %iger Essigsäure.

Entfärbung: in 7 %iger Essigsäure.

Nucleinsäurefärbung: Fixierung mit 1 % Lanthanacetat in 10 %iger Essigsäure über 2 h; danach Färbung mit 1 % Methylenblau in 0,4 M Natriumacetat-Puffer pH 4,6.

Entfärbung unter Sichtkontrolle in Wasser.

2.7. Immunologische Untersuchungen

2.7.1 Gewinnung multivalenter Antiseren *

Zwei männliche Kaninchen (Klein-Chinchilla, 1 Jahr alt, Erka-Mischfutter Z 6000, Wasser ad libitum, Haltung:

* Für die freundliche Überlassung der Seren sei Herrn Prof. Geyer (Marburg) recht herzlich gedankt (31).

Einzelboxen) erhalten insgesamt jeweils 180 mg Protein (Fraktion A oder B), verteilt auf drei Injektionen über einen Zeitraum von sieben Tagen in Verbindung mit Bacto, Adjuvans Freund (Difco).

Injektionsfolge (31):

erster Tag: 30 mg Prot. in 1,0 ml 0,9 %iger NaCl mit 0,05 ml Adjuvans Freund i.m., rechter Schenkel

zweiter Tag: 60 mg Prot. in 2,0 ml 0,9 % NaCl mit 0,10 ml Adjuvans Freund i.m., linker Schenkel

siebter Tag: 90 mg Prot. in 3,0 ml 0,9 % NaCl mit 2,0 ml Adjuvans Freund, je 1,5 ml i.m. linker und rechter Schenkel.

Das Serum wird durch Blutentnahme aus der Ohrvene am 22. Tag (p.i.) gewonnen, mit Natriumacid 1 : 1000 stabilisiert und bei -45°C gelagert.

Die folgenden immunologischen Tests werden sämtlich in der LKB-Standardapparatur mit Zubehör (LKB-Produkte/Stockholm) durchgeführt.

2.7.2 Immunelektrophorese nach GRABAR und WILLIAMS, Mikromethode nach SCHEIDEGGER

1 g Agarose reinst (Serva/Heidelberg) wird in 25 ml H_2O und 25 ml Veronal-Puffer pH 8,2 nach MICHAELIS (32) (Ionenstärke: 0,1) unter Zusatz von 5 mg Cialit^R (Asid/München) gelöst und auf Objektträger (26 x 76 mm) pipettiert. Nach Erstarrung des Gels stanzt man Auftragsbecken ($\varnothing$ 3 mm) und Rinne.

Der Mittelgraben bleibt zunächst unausgehoben. Proben von jeweils 10 - 30 μl werden aufgetragen (Pasteur-

oder Eppendorf-Pipette) und bei 120 V (ca. 6 V/cm) über 3 h elektrophoretisiert. Dabei bilden Filterpapierstreifen die notwendigen Ionenbrücken.

Kammerpuffer: Veronal-Puffer nach MICHAELIS (pH = 8,2; u = 0,1). Nach beendigter Elektrophorese wird die Mittelrinne mit Antiserum aufgefüllt. Nach Lagerung in wassergesättigter Atmosphäre bei 37° C über 12 - 24 h werden die Platten mit 0,9 %iger NaCl-Lösung über 24 h bei dreimaligem Wechsel gewaschen und bei 37° C getrocknet.

Färbung: Lichtgrün 0,5 % in 10 %iger TCA über 1 h; Entfärbung in 10 %iger TCA unter Sichtkontrolle (29).

2.7.3 "Rocket-Immunelektrophorese"

Methode:

Dieses von LAURELL (22) sowie MERILL u. Mitarb. (33) nahezu gleichzeitig entwickelte Verfahren stellt eine Modifikation der einfachen Immunelektrophorese dar. Im Gegensatz zu dieser werden hier elektrophoretische und immunologische Unterschiede zu trennender Proteine nicht nacheinander sondern gleichzeitig genutzt. Das Prinzip der Trennung beruht darauf, daß bei optimalem pH des Trennsystems die zu analysierenden Proteine in antiserumhaltiger Agarose wandern, solange sie sich gegenüber ihren korrespondierenden Antikörpern lokal im Überschuß befinden. Intermediär gebildete Antigen-Antikörper-Komplexe werden also von nachströmendem Antigen so lange wieder aufgelöst, bis der Äquivalenzpunkt der Reaktionspartner erreicht ist. Dort gebildete Präzipitate wandern nicht weiter; die Front ist markiert. Die anfärbbare Präzipitationslinie hat dann die Form eines Gipfels oder einer Rakete (engl. rocket, wonach diese

Methode ihren Namen hat). Bei konstanter Konzentration des Antiserums in der Agarose ist nach LAURELL (34) die Höhe des "rocket" (der Präzipitationslinie) direkt proportional der Konzentration eines Analysenproteins, nach MERILL u. Mitarb. (33) direkt proportional dem log der Konzentration des analysierten Proteins. Der pH des Trennungssystems wird immer so gewählt, daß die Antikörper im Agarose-Gel weitgehend stationär bleiben (30).

Material:

Agarose-Gel und Gelbereitung wie unter 2.7.2

Das flüssige Agarosegel wird im Wasserbad auf 48°C abgekühlt und mit ebenfalls temperiertem Antiserum im Verhältnis 3 : 1 gemischt. Dann trägt man auf eben gelagerte Objektträger oder 70 x 70 mm Glasplatten mittels temperierter Pipette je 3,3 bzw. 8,2 ml dieses Gemisches auf und läßt erkalten. Beckenaushub ($\varnothing$ 3 mm) erfolgt manuell nach Matritze, die Aufbringung der Probenlösung mit einer Hamilton-Spritze (10 μl).

Elektrophorese in CAMAG-Apparatur mit temperierter Kühlplatte bei 3°C über 6 h oder mehr, bis zur vollständigen Ausbildung aller Proteingipfel. Spannung 120 V. Kammerpuffer wie unter 2.7.2; waschen der Gele, siehe 2.7.2. Hier wurden die Gele zur besseren Dokumentation erst gefärbt und dann getrocknet (CROWLE, persönliche Mitteilung u. (30)). Farbstoff: Lichtgrün 0,5 % in 10 %iger TCA über 1 h, Entfärbung in 10 %iger TCA.

2.7.4 Bestimmung der enzymatischen Aktivität von Methyltransferasen aus Proteinfraction B unter dem Einfluß korrespondierender multivalenter Antiseren

Es wurde das unter 2.5 beschriebene Verfahren (Testansatz B) verwendet und folgendermaßen variiert:

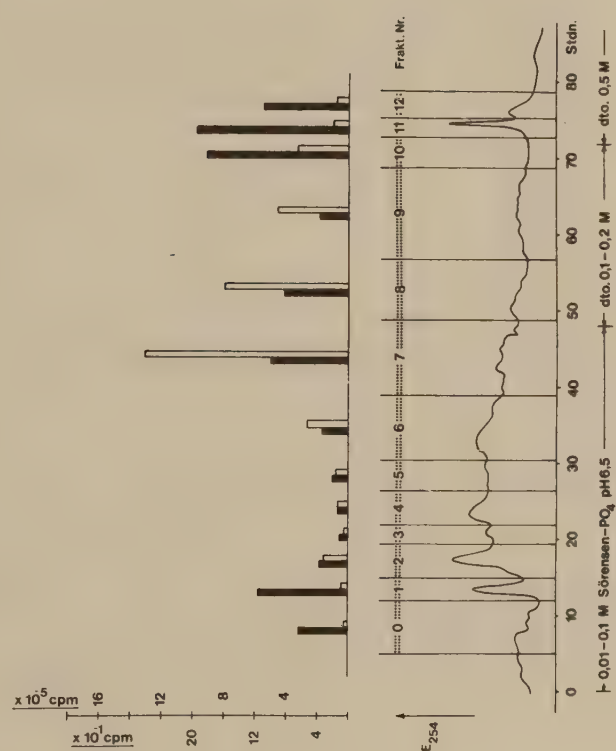
1. Bei gleichzeitiger Analyse von enzymatischer und immunologischer Reaktion wurde der Inkubationspuffer (TMMg, pH = 8,0) stufenweise durch multivalentes Antiserum ersetzt (10 ul-Schritte). Hierfür wurde das Serum vorher über 24-72 h bei 0° C gegen den Puffer dialysiert, um gleiche Ionenverhältnisse zu schaffen.
2. Im anderen Falle wurden die Proteinproben mit undialysiertem Antiserum vorinkubiert und anschließend bei 4000 x g und 0° - 5° C zentrifugiert (Zentrifuge: Mistral L 6, Beckmann). Die enzymatische Aktivität der Überstände wurde dann bestimmt, indem 50 ul entnommen und als Enzymprobe im Standardtest (siehe 2.5 B) eingesetzt wurden.

3. Ergebnisse

3.1 Zerlegung der Proteinfraction A in 12 enzymatisch aktive Subfraktionen und ihre Charakterisierung

Ca. 700 mg Protein, entsalzt an Sephadex G-25 (siehe 2.2.1), wurden an Whatman DE 32 Celluloseionenaustauscher in Sörensenphosphat-Puffer steigender Konzentration säulenchromatographiert (siehe 2.2.2). Das Elutionsprofil zeigt Abb. 3. S. 17.

Abb. 3: Auftrennung von Fraktion A in linearem Sörensen-phosphatgradienten an DEAE-Cellulose (Whatman DE 32).



Bedingungen: Säulenlänge: 400 mm; $\varnothing$ 40 mm

oberer Teil der Abb.:

Methylierung von 2 OD₂EO Substrat in cpm (Standardbedingungen s. unter 2.5).

- pro 10 μg Protein der jeweiligen Subfraktion
- pro Gesamtprotein der jeweiligen Subfraktion

unterer Teil der Abb.:
Elutionsprofil mit Bezeichnung der Fraktionen

Tab. 1: Kenngrößen der Auftrennung von Fraktion A
aus MRE 600 an Whatman DE 32

Frak- tions Nr.	ml	Protein ug / ml	Protein mg pro Fraktion	Protein mg 	Aktivität in cpm/10 ug	errechnete Aktivität in cpm/ Fraktion
0	278,6	16,5	4,6	4,6	64	29.440
1	119,4	37,0	4,4	9,0	116	51.000
2	179,1	240,0	43,0	52,0	37	159.100
3	99,5	245,0	24,4	76,4	11	26.840
4	179,1	285,0	51,0	127,4	14	71.400
5	159,2	265,0	42,2	169,6	20	84.400
6	338,3	245,0	82,9	252,5	33	273.570
7	398,0	330,0	131,3	383,8	100	1.313.000
8	318,4	305,0	97,1	480,9	83	805.930
9	477,6	260,0	124,2	605,1	37	459.540
10	159,2	115,0	18,3	623,4	182	333.060
11	99,5	50,5	5,0	673,6	196	98.392
12	139,3	49,5	6,9	680,5	110	75.900

Das Eluat wurde in 12 Subfraktionen gegliedert, deren Proteingehalt und Methyltransferaseaktivität anschließend nach 2.4 und 2.5 bestimmt wurden. Diese Kenngrößen gibt Tab. 1 wieder. (S. 18)

Wird die Methylierung von untermethylierter tRNA durch Fraktion A in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration bestimmt, so ergibt sich eine nahezu lineare Funktion im Bereich von 0 - 400 ug Fraktion-A-Protein (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Relation zwischen Fraktion A-Protein und Einbau von Methylgruppen in tRNA CH₃-.
(s. 2.5)

Proteinkonzentration	Aktivität
60 ug	332 cpm
120 ug	538 cpm
180 ug	892 cpm
240 ug	1113 cpm
360 ug	1482 cpm

linke Spalte: Proteingehalt der Proben aus Fraktion A-Verdünnungen

rechte Spalte: cpm aus der Methylierung von 2 OD₂₆₀ Substrat unter Standardbedingungen
(2.5)

Obwohl die Proteinkonzentration der 12 Subfraktionen pro 100 ul Testeinsatz (siehe 2.5) differierte, und somit auch unterschiedliche Proteinmengen inkubiert wurden, lassen sich aufgrund dieser Linearität die Enzymaktivitäten der Subfraktionen vergleichen, wenn man

auf eine gemeinsame, theoretische Konzentration von 10 ug umrechnet (siehe Tab. 1 und Abb. 3 oberer Teil).

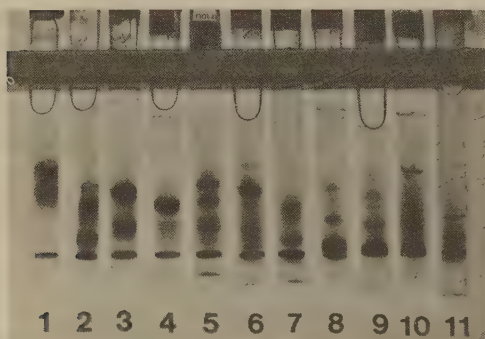
Es lassen sich drei charakteristische Bereiche unterscheiden. Im Anfangs- und Endgebiet der Gradiententrennung werden enzymatisch relativ hochaktive Proteinfractionen eluiert (Subfrakt. 1, Subfrakt. 11 und 12).

Im Mittelteil der Elution (Subfrakt. 7 und 8) liegen recht aktive Methyltransferasen, die jedoch stark mit anderen Proteinen vermischt sind. In den Zwischengebieten sind ebenfalls noch diverse, schwächere Aktivitäten meßbar. Sie sind mit Sicherheit verschiedenen Enzymen zuzuschlagen, da der Gradient am Ende das 50-fache seiner Anfangskonzentration erreicht und somit große Unterschiede in den Ablösekonzentrationen der einzelnen Proteine, bzw. ihrer formalen Nettoladung bestehen müssen.

Diese Deutungen bestätigten sich in der anschließenden analytischen Disk-Elektrophorese (siehe 2.6) der einzelnen Subfraktionen. Hohe 10 ug-Aktivitäten mit niedriger Gesamtaktivität der betreffenden Subfraktion wiesen einige, wenige Proteinbanden auf und umgekehrt (vgl. die Bandenverteilung der in Abb. 4 wiedergegebenen Zylindergele).

Zu Beginn der Trennung eluierte Proteine mit theoretisch geringer Nettoladung am Molekül wandern in der Disk-Elektrophorese erwartungsgemäß langsam, während gegen Ende der Elution erscheinende Proteine entsprechend weit in das PAA-Gel einwandern.

Abb. 4: Zylindergele der analytischen PAA-Disk-Elektrophorese von Subfraktion 1 - 11

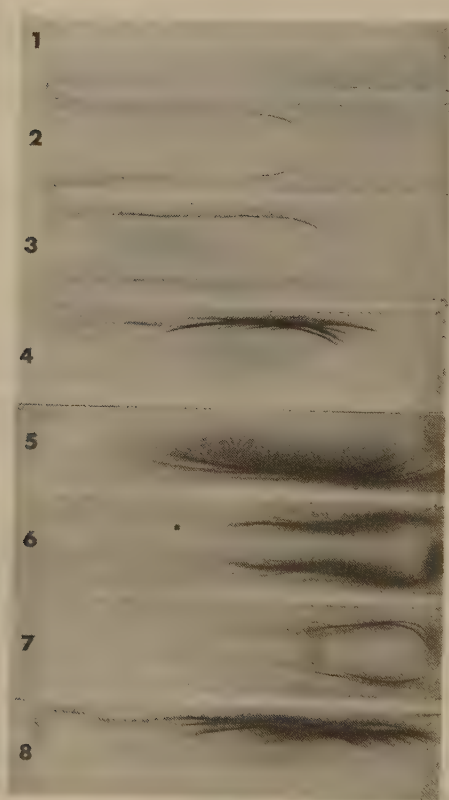


Bedingungen: Zylindergele $\varnothing = 5 \text{ mm}$; 5,6 %iges PAA
Proteinfärbung: Amidoschwarz 10 B
Anode unten

Ein ähnliches Verteilungsmuster der Proteinkomponenten dieser Subfraktionen wurde aus der anschließend durchgeführten Immunelektrophorese (2.7.2) deutlich. Gegenüber der Disk-Elektrophorese trat jedoch eine größere Zahl differenzierbarer Banden auf (siehe Abb. 5). Diese Tatsache ist damit zu begründen, daß die Proteine bei definiertem pH unabhängig von ihrer Molekülgröße allein nach Ladungsunterschieden getrennt und über ihre hochspezifische immunologische Determinanz lokalisiert werden.

Die aus der Gradiententrennung gewonnenen Subfraktionen scheinen letztlich also noch wesentlich komplexer zusammengesetzt zu sein, als es die analytische Disk-Elektrophorese zeigen kann.

Abb. 5: Immunelektrophoretische Analyse der Subfraktionen 1-8



Bedingungen:

2 %iges Agarosegel in Veronal-Puffer pH 8,2 (32)

Proteinauftrag 10 - 30 ul = ca. 0,37 - 9,9 ug

Proteinfärbung: Lichtgrün 0,5 % in 10 %iger TCA

Elektrophorese: siehe 2.7.2

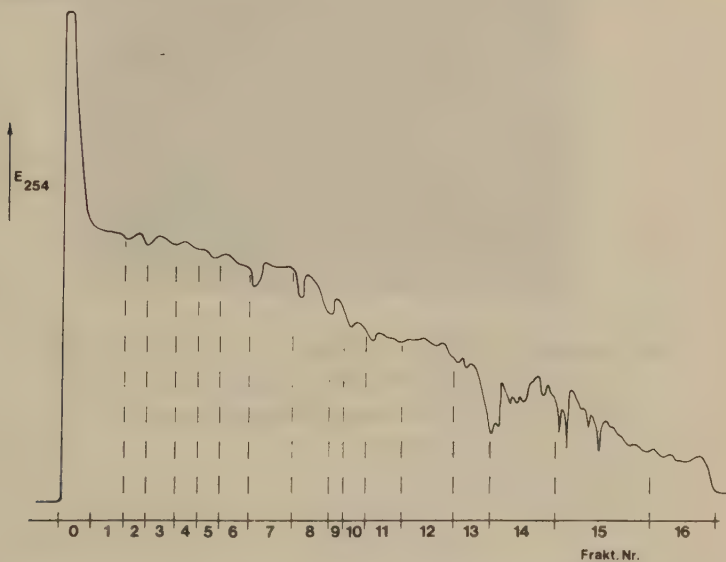
Anode rechts

3.2 Präparative Disk-Elektrophorese von Subfraktion 7

Nach Vergleich der Charakteristika einzelner Subfraktionen (s. Abb. 3 u. Tab. 1), sowie besonders der entsprechenden Disk- und Immunelektrophoresen erschien uns die Subfraktion 7 zur weiteren Auftrennung am geeignetsten. Sie weist den höchsten Proteingehalt verbunden mit der höchsten Gesamtaktivität auf und besitzt eine relativ geringe Zahl an Proteinkomponenten (s. Abb. 4 u. 5).

Eine präparative, diskontinuierliche Gelelektrophorese dieser Subfraktion wurde zunächst mit 100 mg Protein (nach 2.3) vorgenommen (Elution I). Das Eluat gliederten wir in 17 Anteile (siehe Abb. 6), die die Bezeichnung (7/SSO - SS 16) tragen, da sie aus einer vorgetrennten Subfraktion eluiert wurden.

Abb. 6:
Durchflußspektrometrisches Elutionsprofil der präparativen PAA-Disk-Elektrophorese von Subfraktion 7, Elution I



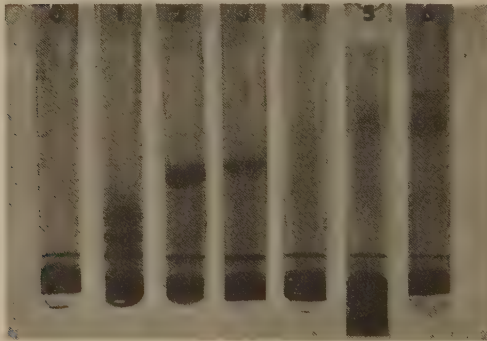
Elektrophoresebedingungen sowie Fraktionierung s. 2.3

Weitere Aufschlüsse über Proteingehalt und Komponenten-zusammensetzung der eluierten Anteile wurden aus den unter 2.4, 2.5, 2.6 und 2.7.2 beschriebenen Verfahren gewonnen. Die Charakteristika zeigt Tab. 3 auf S. 25.

Es sind hier nur die ersten 12 Sub-Subfraktionen wiedergegeben. SS-0 bleibt unbeachtet, da sie die zur Stabilisierung verwendete Hefe-RNA (siehe 2.2.2) enthält.

Die Bandenverteilung in der analytischen PAA-Zylindergel-Elektrophorese nach 2.6 ist für die ersten 6 Sub-Subfraktionen in Abb. 7 wiedergegeben.

Abb. 7: Zylindergelgele der analytischen PAA-Disk-Elektrophorese von SS-0 bis SS-6 aus Subfrakt. 7/I



Bedingungen: 5,6 %ige PAA-Zylindergelgele, $\varnothing = 5$ mm
Proteinfärbung: Amidoschwarz 10 B
0 enthält die RNA-Profilspitze
Anode unten

Tab. 3: Kenndaten der präparativen Disk-Elektrophorese von Subfraktion 7 (Elution I)

Fraktion Nr.	Fraktion ml	Protein ug/ml Frakt. gemessen	Protein ug/ml Frakt. korrigiert ^{xx)}	Protein mg/Frakt.	Protein mg ◇
7/SS 1	122	295	185	22,57 ^{x)}	
7/SS 2	36,6	340	230	8,418	8,418
7/SS 3	48,8	250	140	6,832	15,250
7/SS 4	36,6	260	150	5,490	20,740
7/SS 5	36,6	270	160	5,856	26,596
7/SS 6	48,8	260	150	7,320	33,916
7/SS 7	73,2	260	150	10,980	44,896
7/SS 8	61,0	245	135	8,235	53,131
7/SS 9	24,4	255	145	3,538	56,669
7/SS 10	36,6	265	155	5,673	62,342
7/SS 11	61,0	230	120	7,320	69,662
7/SS 12	85,4	225	115	9,821	79,483

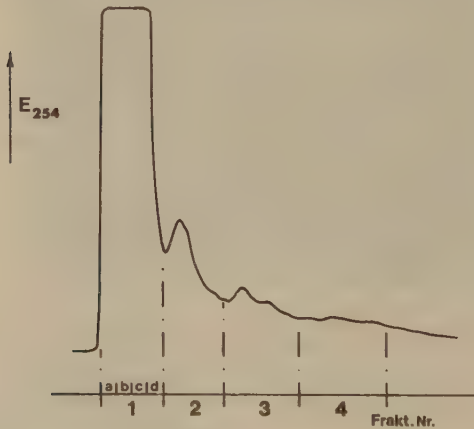
x) enthält hauptsächlich RNA

xx) korrigierte Proteinmessung nach 2.4.2. Aus dem PAA-Gel genannter Konzentration (siehe 2.3) werden kontinuierlich 8,167 mg niedermolekulares Polyacrylamid pro Stunde ausgeschwemmt. Bei einem Durchsatz von 49,5 ml/h enthält danach 1 ml Eluat 165 ug "proteinähnliche" Verunreinigungen. Da pro ml Fraktion 0,33 ml RNA-Lösung vorgelegt werden, sind als ausgeschwemmtes PAA 110 ug/ml Fraktion anzusetzen.

Im Vergleich mit den Aktivitätsmessungen nach 2.5 galt unser größtes Interesse den Sub-Subfraktionen 1 und 2. Diese zeigten nämlich als einzige Methyltransferaseaktivität; und zwar Sub-Subfraktion-1 : 63 cpm und Sub-Subfraktion-2 : 133 cpm.

Bevor wir diese weiter untersuchten, haben wir angestrebt, die ersten vier Proteinbanden aus Subfraktion 7 noch besser voneinander zu trennen. Hierzu wurden 30 ug Protein der Subfraktion 7 in einer kleineren Trennkammer präparativ disk-elektrophoresiert (5,6 %iges PAA-Gel; siehe 2.3). Das Elutionsprofil mit der Gliederung in die 4 Proteinanteile zeigt Abb. 8 (Elution II).

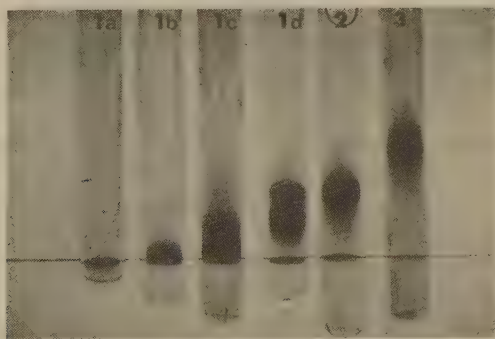
Abb.8: Durchflußspektrometrisches Elutionsprofil der präparativen PAA-Diskelektrophorese von 30 ug Subfraktion-7-Protein (Elution II)



Elektrophoresebedingungen wie unter 2.3 jedoch mit Trennkammer: 150 x 190 x 4 mm

Wie die anschließende analytische Disk-Elektrophorese zeigte (Abb. 9), konnte die Trennung durch dieses Verfahren nicht verbessert werden, jedoch war die Verteilung der Aktivitäten in den Sub-Subfraktionen (Methyltransferase-Test nach 2.5) günstiger. Anteil 2 dieser Trennung, die elutionsmäßig fast identisch mit SS-2 der ersten Trennung (Elution I) war, enthielt nahezu die gesamte bestimmbare Enzymaktivität, nämlich 330 cpm gegenüber nur 9 cpm in SS-3 dieser Elution. Weitere Aktivitäten waren nicht auffindbar.

Abb. 9: Zylindergele der analytischen PAA-Disk-Elektrophorese von SS-1 bis SS-3 aus Subfraktion 7/ Elution II



Bedingungen: 5,6 %ige PAA-Zylindergele, $\varnothing = 5$ mm

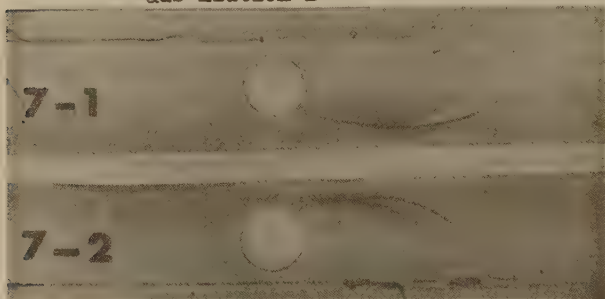
Anode unten

Proteinfärbung: Amidoschwarz 10 B

SS 1 a-d entsprechend Elutionsprofil Abb.8

Die Immunelektrophorese von SS-2 nach 2.7.2 erbrachte zwei deutliche Präzipitationsbögen (siehe Abb. 10) wie es aus der analytischen PAA-Diskelektrophorese (Abb. 7) zu erwarten war.

Abb. 10: Immunelektrophorese von 7/SS-1 und 7/SS-2
aus Elution I

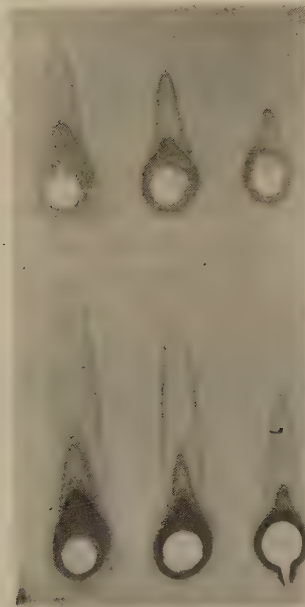


Bedingungen: 2 %iges Agarose-Gel in Veronal-Puffer
Färbung: Lichtgrün 5 %ig in 10 % TCA
Proteinauftrag: ca. 6 ug
Anode rechts

Die "Rocket-Immunelektrophorese" nach LAURELL (2.7.3) hingegen lieferte mit wesentlich geringeren Proteinmengen eine noch weit höhere Differenzierung. Die lupenoptische Auswertung der Immunelektropherogramme zeigte für 7/SS-2 mindestens fünf distinkte Gipfel.

Es wurde SS-2 gegenüber der Ausgangsfraction 7 in drei Konzentrationen untersucht. Die Bandenverteilung im antiserumhaltigen Agarosegel (2 %ige Agarose; 25 %ig an multivalentem "Anti-Fraktion A-Serum") gibt die Abb. 11 wieder.

Abb. 11: "Rocket-Immunelektrophorese" von Subfraktion 7 und daraus gewonnenem Anteil 7/SS-2; Elution I



obere Reihe:
SS-2 in folgender
Protein-Konzentra-
tion: li - re:
3,45 ug, 2,30 ug,
1,15 ug

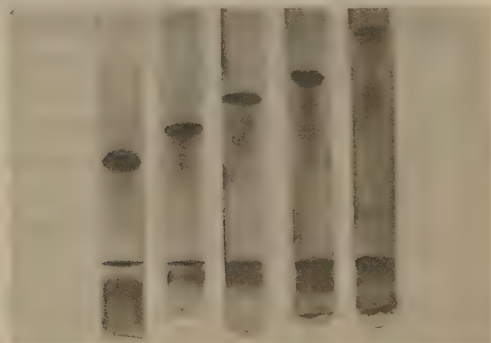
untere Reihe:
Subfraktion 7
(Elution I) in
folgender Protein-
konzentration:
li - re: 4,95 ug,
3,30 ug, 1,65 ug

Bedingungen: 2 %ige Agarose, 25 %ig an multivalentem
"Anti-Fraktion A-Serum"
Proteinfärbung: Lichtgrün 5 %ig in
10 % TCA
Elektrophoresebedingungen siehe 2.7.3
Anode oben

Die "Rocket-Immunelektrophorese" hatte somit gezeigt, daß die sowohl in 5,6 %igem PAA-Gel (Disk-Elektrophorese) als auch im 2 %igen Agarosegel (Immunelektrophorese) relativ sauber erscheinende Doppelbande doch noch mehrere Komponenten enthält.

Daher haben wir auf den Anteil SS-2 abschließend noch eine modifizierte analytische PAA-Diskelektrophorese angewendet. Es wurden hier die Gelkonzentrationen der PAA-Zylindergele variiert, um den Siebeffekt des Polyacrylamids besser auszunutzen. Die Konzentrationsreihe umfaßt folgende Werte: 5,6 %; 6,3 %; 7,0 %; 8,4 %; 9,8 %; das Verteilungsmuster der mit Amidoschwarz gefärbten Proteinbanden gibt Abb. 12 wieder.

Abb. 12: Zylindergele der analytischen PAA-Disk-Elektrophorese von SS-2 aus Subfraktion 7 (Elution I) in Gelen steigender Konzentration



Bedingungen: Elektrophorese wie unter 2.6
Gelkonzentrationen: von li. nach re.
5,6 %, 6,3 %, 7,0%, 8,4 %, 9,8 %
Proteinfärbung: Amidoschwarz 10 B
Anode unten

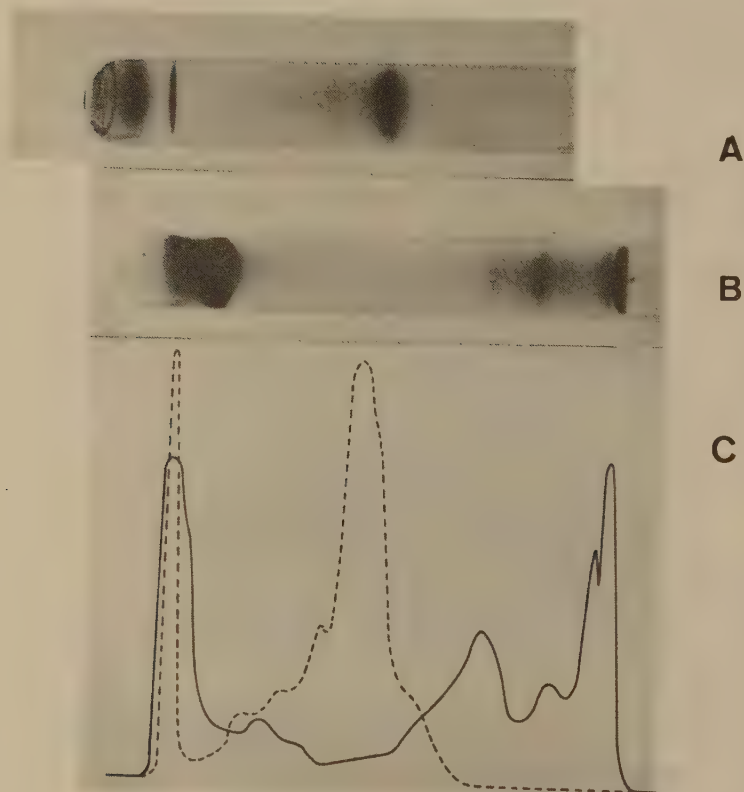
Es ist ersichtlich, daß

- a) die Hauptbande proportional zur steigenden PAA-Gelkonzentration retardiert wird, d.h. weniger weit in das Gel einwandert;
- b) diese Bande sich mit zunehmender Gelkonzentration deutlich weiter aufgliedert und mehrere schneller wandernde Komponenten vor ihr erscheinen;
- c) insgesamt ca. 5 Komponenten auftreten (inklusive Hauptbande) und somit eine mit der "Rocket-Immunelektrophorese" identische Bandenzahl besteht (siehe Abb. 13 B).

Tastet man ein 5,6 %iges und 9,8 %iges PAA-Gel (gefärbt mit Amidoschwarz 10 B) im Vergleich zueinander densitometrisch ab (Densitometer DD 2, Micrograph BD 5; Kipp & Zonen/Delft, Holland), wird die Bandenretardierung sowie die Verteilung der Komponenten besonders deutlich (siehe Abb. 13 A,B,C).

Die endgültige Klärung der Frage, welcher dieser Proteinbanden der 7/SS-2 die enzymatische Aktivität zuzuschreiben ist oder ob eventuell sogar mehrere Enzyme in ihr vorliegen, muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben. So könnten z.B. in einer analytischen PAA-Zylindergel-Elektrophorese nach 2.6 differenzierte Proteine aus einem ebenso behandelten aber ungefärbten Gel parallel ausgeschnitten und mit Hilfe von Elektrodialyse (53, 54, 55) wiedergewonnen werden. Diese ließen sich dann separat auf enzymatische Aktivitäten untersuchen. Zusätzlich müßten sie allerdings auch auf ihre Basenspezifität geprüft werden.

Abb. 13 (A,B,C): Bandenverteilung der analytischen PAA-Diskelektrophorese von SS-2 aus Subfraktion 7 (Elution I)



A: 5,6 %iges PAA-Zylindergel; Anode & Pufferfront li

B: 9,8 %iges PAA-Zylindergel; ebenso

C: Profil der densitrometrischen Abtastung beider Gele entsprechend von li. nach re.

1. Gipfel links: Marker

5,6 %iges Gel -----

9,8 %iges Gel —————

3.3 Der Einfluß multivalenter Antiseren gegen Proteinfraktion B auf korrespondierende tRNA-Methyltransferasen

Die unter 2.7 beschriebenen immunologischen Techniken zeigen gegenüber der elektrophoretischen Trennung in Polyacrylamid-Gelen eine weit höhere Nachweisempfindlichkeit (vgl. 3.2). Es können jedoch die Präzipitationsbanden nicht mehr auf ihre enzymatische Aktivität geprüft werden. Eine spezifische Färbemethode, die es entsprechend den Arbeiten von URIEL (36) möglich machen würde, Präzipitationslinien von Enzym-Antienzym-Komplexen neben Präzipitaten von Begleitproteinen sichtbar zu machen, besteht für tRNA-Methyltransferasen nicht.

Diese Schwierigkeiten machen es notwendig, neue Kombinationen bestehender Standardmethoden zu entwickeln. Als Vorarbeiten dazu haben wir untersucht, welchen Einfluß Antikörper gegen tRNA-Methyltransferasen auf diese Enzyme haben.

Untersuchungen an Enzym-Antienzym-Systemen sind und werden von zahlreichen Arbeitsgruppen durchgeführt (37 - 43). Das Spektrum der Enzym-Antienzym-Wechselwirkung reicht in den verschiedenen untersuchten Systemen von einer totalen Enzymhemmung über partielle Hemmung und unbehinderte Enzymaktivität bis hin zu einer Aktivierung der Katalyse durch spezifische Antikörper (s. Tab. 1, CINADER, 37 sowie 40, 41).

Im allgemeinen werden solche Experimente mit reinen Enzymen oder/und Antikörpern durchgeführt. Uns war es jedoch nur möglich, mit methyltransferaseaktiven Protein-

gemischen und korrespondierenden multivalenten Antisera zu arbeiten, da gereinigte Methyltransferasen noch nicht vorliegen. Alle Ergebnisse und Deutungen müssen somit unter dem Vorbehalt betrachtet werden, daß gereinigte Enzyme oder Antikörper möglicherweise ein anderes Verhalten zeigen. Wir hielten die Fragestellung jedoch für so wichtig, daß sie bereits unter diesen Bedingungen angegangen wurde.

Als Untersuchungsmaterial verwendeten wir Proteinlösungen der Fraktion B (siehe 2.1), die wegen höherer Methyltransferaseaktivitäten geeigneter als Fraktion A schienen. Die verwendeten Antisera waren durch Immunisierung von Kaninchen nach 2.7.1 mit Fraktion B-Proteinen gewonnen worden. Zur Bestimmung der Substrat-Methylierung wurde der unter 2.7.4 beschriebene variierte Standard-Test durchgeführt.

3.3.1 Bestimmung der tRNA-Methylierung in Anwesenheit des Antiserums

Wir haben zunächst die tRNA CH_3 -Methylierung durch eine konstante Menge Fraktion B-Protein (305 μg / Ansatz) unter dem Einfluß steigender Volumina Antiserum bestimmt. Dazu wurde der Inkubationspuffer des Standard-Ansatzes in 10 μl -Schritten kontinuierlich durch dialysiertes Antiserum (2.7.4) ersetzt und diese Proben, wie unter 2.5 angegeben, 2 h bei 37° inkubiert.

Es zeigte sich, daß im Falle gleichzeitigen Starts von Immun- und Enzymreaktion ca. 50 % weniger Methylgruppen in das Substrat eingebaut werden. Die Hemmwirkung pro

10 ul Antiserum verringert sich je höher die Gesamtkonzentration an Antikörpern im Ansatz wird (siehe hierzu Tab. 4). Die 50 %ige Hemmung ist bei einem Antiserumgehalt von 40 - 50 ul des verwendeten Serums erreicht (Abb. 14).

Tab. 4: Einfluß von multivalentem Fraktion B-Antiserum auf die Methylierung untermethylierter tRNA

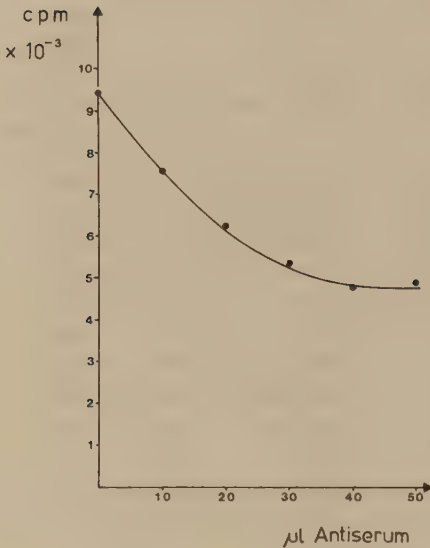
Verhältnis Puffer: As. pro Ansatz	Verhältnis Enzym-: As- Protein	Methylierung in cpm; Voll-Leer = Differenz	cpm in %
5 : 0	1 : 0	9609-137 = 9472	100
4 : 1	1 : 1,8	7822-242 = 7580	80
3 : 2	1 : 3,7	6658-395 = 6263	66
2 : 3	1 : 5,6	5871-498 = 5373	56
1 : 4	1 : 7,5	5428-636 = 4792	50
0 : 5	1 : 9,4	5659-727 = 4932	52

Fraktion B-Protein 305 ug/Ansatz

Fraktion A-Antiserum: 575 ug/ 10 ul

Der Einfluß des Antiserums auf die Methylierung läßt sich in typischer Weise graphisch darstellen und ergibt eine "Enzym-Hemmkurve" wie sie von POLLOCK (44) für das Penicillinase-Antipenicillinase-System aufgezeigt wurde (Abb. 14). Die Kurve zeigt eine asymptotische Näherung bei ca. 5000 cpm, was einem Aktivitätsverlust von 50 % entspricht.

Abb. 14: Enzym-Hemmkurve für Fraktion B Methyltransferasen durch korrespondierende Antikörper



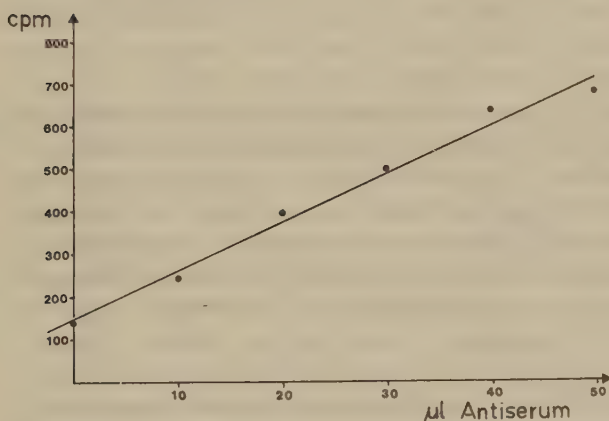
Ordinate:
enzymatische Aktivität der Proben
(305 µg Protein)
in cpm pro
2 OD_{260nm} tRNA CH₃

Abszisse:
Volumina zugesetzten Fraktion B-Antiserums (Proteingehalt: 575 µg/10 µl)

Neben der Enzymhemmung haben wir untersucht, ob das Fraktion B-Antiserum Methylierungsaktivität hat. Hierzu wurden ein Voll- sowie Leerwert mit je 50 µl Antiserum anstelle des üblichen Enzymproteins im Standard-Ansatz inkubiert (2.5, B). Die ermittelte Radioaktivität lag bei 519/521 cpm (voll/leer). Da im Leerwert dieses Reaktionsansatzes, entsprechend den Leerwerten der üblichen Proben (2.5), kein Substrat (tRNA als Methylgruppen-Acceptor) enthalten ist und Voll- wie Leerwert annähernd gleiche cpm aufweisen, muß die er-

mittelte Radioaktivität einer unspezifischen Adsorption von markiertem SAM durch das eingebrachte Testprotein zugeschrieben werden. Diese unspezifische Adsorption radioaktiven Materials ist der Menge zugesetzten Antiserums im Standard-Test linear proportional, wie Abb. 15 zeigt.

Abb. 15: Unspezifische $^{14}\text{CH}_3$ -SAM-Adsorption durch steigende Mengen Fraktion B-Antiserum im Standard-Test



Ordinate: Adsorption von $^{14}\text{CH}_3$ -SAM in cpm

Abszisse: Volumen Antiserum/Testansatz (Leerwerte aus vorgenanntem Versuch)

Der Schnittpunkt mit der Ordinate entspricht der Adsorption durch 305 µg Protein aus Fraktion B (Probe ohne Antiserumzusatz).

Die unspezifische Adsorption radioaktiven Materials entspricht also ca. 100 cpm/ 10 μ l Antiserumzusatz oder 100 cpm/ 575 μ g Antiserum-Protein (Tab. 4 und Abb. 15).

Die in der Literatur diskutierten Mechanismen der Wechselwirkung zwischen Enzymen und ihren Antikörpern (37, 38, 48) bieten im Vergleich mit den Ergebnissen des o.g. Tests folgende Deutungsmöglichkeiten für das tRNA-Methyltransferase-Antimethyltransferase-System:

1. Die spezifische Bindung zwischen Methyltransferasen und ihren Antikörpern bildet sich langsamer aus, als die zwischen den Enzymen und ihrem Substrat. So können schon Methylgruppen übertragen werden, bevor die Antikörper ihre enzymhemmende Wirkung entfalten. Die Restmethylierung von ca. 50 % entspräche dann zum größten Teil den vor Eintritt der Hemmung übertragenen Methylgruppen. Gegen diese Annahme spricht, daß die Komplexbildung zwischen Antigen und Antikörper im allgemeinen innerhalb weniger Minuten abläuft (30) und zudem die Methylierung von tRNA CH_3 - eine langsame Reaktion ist.
2. Es sind nur 50 % der in den Proben enthaltenen Enzyme inaktiviert worden, die restlichen Methyltransferasen sind noch voll aktiv. Diese Annahme läßt sich so lange nicht klären, wie wir mit Enzymgemischen arbeiten müssen und nicht einzelne isolierte Enzyme untersuchen können.
3. Da Präzipitate teilweise sichtbar sind, ist nicht auszuschließen, daß tRNA mit diesen mitgerissen wird und so zur Radioaktivitätsmessung nicht mehr entnommen werden kann. Die Methylierung dieses Substratan-

teils kann dann nicht mehr bestimmt werden. Der Methylgruppenverlust entspräche dann teilweise oder ganz dieser nicht erfaßten tRNA.

4. Die 50 % Restmethylierung beruhen auf der Aktivität noch freier katalytischer Bezirke an den Enzym-Antienzym-Komplexen (Residualaktivität nach POLLOCK, 44). Diese Interpretation des Ergebnisses aus der beschriebenen Untersuchung (3.3.1) erschien uns am wahrscheinlichsten und hat daher unser weiteres Vorgehen bestimmt.

3.3.2 Bestimmung der tRNA-Methylierung nach Vorinkubation der Enzyme mit dem korrespondierenden Antiserum

Um Klarheit in diese Deutungsmöglichkeiten zu bringen, haben wir statt gleichzeitigen Starts von Immun- und Enzymreaktion (3.3.1) Enzymlösungen mit dem Antiserum vorinkubiert. Dabei konnte in den Grenzen der Methode nicht vermieden werden, daß die Bestimmung der Enzymaktivität in den Überständen der zentrifugierten Proben mit einem Verdünnungsfehler belastet war. Wir konnten auf eine Kontrolle des Verdünnungseffekts verzichten, da eine lineare Relation zwischen Methylierungsaktivität und Enzymprotein-Einsatz im Bereich von 0-400 µg besteht (siehe 3.1) und wir mit diesen Konzentrationen arbeiteten. Die Korrektur erfolgte entsprechend rechnerisch.

Die Vorinkubation der Proben wurde zunächst bei 37° C - entsprechend der Temperatur im enzymatischen Test - vorgenommen. Es zeigte sich jedoch, daß die Enzyme schon

70 % - 80 % ihrer Methylierungsaktivität verlieren, wenn sie nur 15 min bei dieser Temperatur vorinkubiert werden. Dieser Befund stimmt mit denen aus Stabilisierungsuntersuchungen an Methyltransferasen überein (23, 45). Unter diesen Bedingungen ist der Einfluß der Antikörper auf die Enzyme nicht bestimmbar. Deshalb wurde bei 4° C vorinkubiert. Bei dieser Temperatur sind die Methyltransferasen der Fraktion B weitgehend stabil.

Erst danach wurde die enzymatische Aktivität bestimmt, indem aus dem Überstand der für 30 min in Kälte zentrifugierten Proben (2.7.4, 2) 50 ul entnommen und als Proteineinsatz im Standard-Aktivitätstest untersucht wurden.

Im Vergleich mit dem unter 3.3.1 beschriebenen Testablauf finden wir hier, nach Vorinkubation des Enzymproteins mit seinem Antiserum eine etwas größere Enzymhemmung (siehe Tab. 5).

Tab. 5: Methylierung von 2 OD₂₆₀ tRNA durch Fraktion B-Protein nach Vorinkubation mit korrespondierendem Antiserum

Verhältnis Enzym-Anti- serumprotein Vorinkubation	ug Enzym- protein im Aktivitäts Test	Methyl- übertra- gung in cpm	cpm in %
1 : 0	210	4645	100
1 : 0, 6	190	2857	68
1 : 1, 3	175	2362	61
1 : 2, 0	161	2369	67
1 : 2, 7	150	1258	38
1 : 3, 4	140	1200	39
1 : 4, 1	131	1328	46

zu Tab. 5:

Fraktion B-Protein : 420 ug/ Ansatz Vorinkubation
Antiserum : 575 ug/ 10 ul; zugegeben in
5 ul-Schritten

Daraus könnten folgende Schlüsse gezogen werden:

1. Im Antiserum liegen Antikörper gegen die aktiven Zentren der Enzyme vor und konkurrieren mit dem Substrat um diese (kompetitive Hemmung). Dagegen spricht, daß die katalytischen Zentren im allgemeinen nur einen geringen Prozentsatz der möglichen determinanten Stellen für die Antikörperbildung gegen Enzymmoleküle ausmachen (38).
2. Antikörper binden sich an Bereiche nahe dem aktiven Zentrum der Enzyme und machen dieses somit für das Substrat unzugänglich (sterische Hinderung, 46, 47, 48).
3. Antikörper lagern sich außerhalb des aktiven Zentrums an und bedingen so eine konformative Änderung des gesamten Enzymmoleküls; das aktive Zentrum wird blockiert.

Bei unserem weiteren Vorgehen haben wir uns daraufhin von zwei Gesichtspunkten leiten lassen:

- A) Unter Annahme eines kompetitiven Hemmechanismus wurde die Antiserumkonzentration im Standardtest (gleichzeitige Inkubation wie unter 3.3.1 beschrieben) weiter erhöht, um das Verhältnis der konkurrierenden Partner der Reaktion (Antikörper und tRNA) zugunsten der Antikörper zu verschieben.

B) Andererseits wurde aus den Überständen vorinkubierter und zentrifugierter Ansätze mit hohem Antiserumüberschuß die Aktivität der Enzyme bestimmt, nachdem diese für eine gewisse Zeit allein den Antikörpern ausgesetzt waren.

Anlaß zu diesem Vorgehen waren einerseits Arbeiten von MARUGGI und MAYER (49), die höchste Inaktivierungsraten von Enzymen im extremen Antiserumüberschuß beschrieben haben; andererseits hatten BUEDING (50), SEVAG (51) sowie ZAMECNIK (52) zeigen können, daß offenbar Substrate enzymatischer Reaktionen eine Inaktivierung der Enzyme durch ihre Antikörper verhindern können.

3.3.3 Bestimmung der Methylierung in Anwesenheit des Antiserums in hohem Überschuß

Der Antiserumzusatz wurde im Standardtest (2.7.4, 1) bei gleichzeitiger Immun- und Enzymreaktion (wie 3.3.1) stufenweise bis zu einem 23,3-fachen Überschuß erhöht (Proteinkonzentration). Um diesen hohen Antiserumüberschuß zu erzielen, mußten die untersuchten Enzymlösungen entsprechend verdünnt werden, da im Standardtest (konstantes Volumen) nur maximal 50 μ l des Antiserums zugegeben werden konnten (Verdünnung siehe Tab. 6). Die Proben wurden ferner nach der 2 h-Inkubation zentrifugiert (2.7.4, 2), um Präzipitate zur Scintillationszählung nicht mit zu entnehmen.

Wie aus Tab. 6 S. 43 zu ersehen, beträgt die tRNA-Methylierung im Ansatz mit 23,3-fachem Antiserumüberschuß noch ca. 33 % der Kontrolle K 3. die graphische Darstellung der gemittelten cpm-Werte der Proben ergibt wiederum annähernd "typische" Enzym-Hemmkurven (Abb. 16, S. 44).

Tab. 6: Einfluß steigender Konzentrationen Fraktion B-Antiserum auf die Aktivität korrespondierender Enzyme

Probe	Verhältnis Enzymprotein zu Antiserumprotein	Methylübertragung in cpm	cpm in % der Kontr.
K 1		6853	100
A 1	1 : 1,55	5215	76
A 2	1 : 3,10	3832	55
A 3	1 : 4,60	3933	57
A 4	1 : 6,20	3197	47
A 5	1 : 7,70	3399	49
K 2		4715	100
B 1	1 : 3,10	4059	86
B 2	1 : 6,20	2696	57
B 3	1 : 9,30	2123	45
B 4	1 : 12,40	2246	47
B 5	1 : 15,50	1678	35
K 3		2400	100
C 1	1 : 4,60	2058	85
C 2	1 : 9,30	1086	45
C 3	1 : 14,00	1454	50
C 4	1 : 18,60	1021	42
C 5	1 : 23,30	801	33

Proteingehalt der Proben:

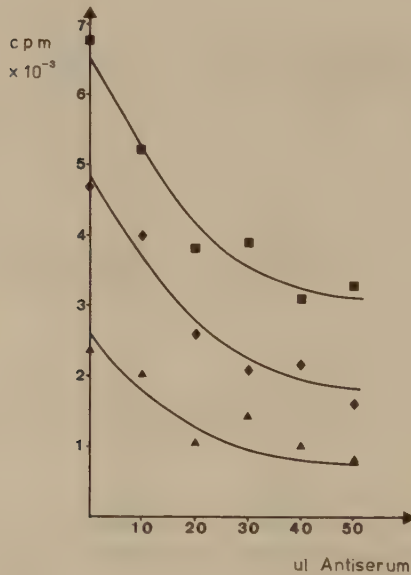
K 1 + A 1-5 : je 370 ug Fraktion B-Protein

K 2 + B 1-5 : je 185 ug Fraktion B-Protein

K 3 + C 1-5 : je 123 ug Fraktion B-Protein

Proteingehalt Fraktion B-Antiserum: 575 ug/ 10 ul

Abb. 16: Enzym-Hemmkurve von drei Probenreihen Proteinfraktion B durch korrespondierendes Antiserum



Ordinate: enzymatische Methylierung von 2 OD Substrat
in cpm

Abszisse: Volumina zugesetzten Antiserums.

- = Fraktion B-Protein unverdünnnt (370 ug/ Ansatz)
- ◆ = Fraktion B-Protein verdünnt 1:2 (185 ug/ Ansatz)
- ▲ = Fraktion B-Protein verdünnt 1:3 (123 ug/ Ansatz)

Antiserum: Proteingehalt = 575 ug / 10 ul

Diese Versuchsanordnung zeigt, daß auch eine weitere Erhöhung der Antiserumkonzentration bis zu einem ca. 23,3-fachen Überschuß (Proteingehalt) nur eine unwesentliche Steigerung der Enzymhemmung bedingt, wie aus dem asymptotischen Verlauf der Enzym-Hemmkurve in 3.3.1 schon zu erwarten war. Dieser Befund stimmt mit dem Postulat von POLLOCK (44) überein, das er aus seinen Arbeiten am Penicillinase-Antipenicillinase-System gezogen hat.

Es ist jedoch auch zu erkennen (Abb. 16 u. Tab. 6), daß immer ca. 50 μ l Antiserum notwendig sind, um eine als maximal erscheinende Enzymhemmung zu erreichen, unabhängig davon, wieviel Enzymprotein zum Einsatz kommt. Während die Aktivität in den Kontrollproben entsprechend der Verdünnung geringer wird (vgl. Tab 6) findet in den drei untersuchten Probenreihen jeweils eine 50 - 67 %ige Inaktivierung durch die zugesetzten Antikörper statt. Die Inaktivierung ist also direkt abhängig von der absoluten Konzentration der Antikörper im Ansatz.

Dieses Phänomen scheint uns allein dahingehend deutbar, daß eine Konkurrenzreaktion zwischen Substrat und Antikörper um die Enzyme stattfindet. In allen drei Testreihen ist eine Konzentration von ca. 2875 μ g Antiserum-Protein notwendig, um das Substrat ($2 \text{ OD}_{260} \text{ tRNA CH}_3$ -) "optimal" zu verdrängen und die Enzyme somit zu hemmen.

3.3.4 Bestimmung der tRNA-Methylierung nach Vorinkubation der Enzyme mit dem korrespondierenden Antiserum in hohem Überschuß

Drei Proben mit je 540 µg Fraktion B-Protein wurden mit korrespondierendem Antiserum von 160 mg/ml Proteingehalt in folgenden Konzentrationen vorinkubiert:

- a) 88,8-facher Antiserum-Überschuß (Proteineinsatz)
- b) 85,9-facher Antiserum-Überschuß (Proteineinsatz)
- c) 97,7-facher Antiserum-Überschuß (Proteineinsatz)

Die Vorinkubation erfolgte bei 0° C für 30 min; danach schloß sich die Zentrifugation bei gleicher Temperatur über 45 min. in Kälte an. Die enzymatische Aktivität wurde dann nach 3.3.2. und 2.7.4 aus den Überständen bestimmt.

Tab. 7: Methylierung von 2 OD₂₆₀ tRNA durch Frakt. B-Methyltransferasen, die mit hohem Antiserum-überschuß vorinkubiert waren

Probe	errechnete µg Enzymprot.im Aktivitätstest	Aktivität in cpm	Aktivität in % Δ real
Kontrolle	180	2397	100
a	60	286	11,9 Δ 35
b	61	368	15,3 Δ 45
c	56	410	17,1 Δ 54

Die Kontrolle wurde wie die Proben vorinkubiert, jedoch ohne Antiserum.

Der Verlust an Aktivität durch die Enzymverdünnung ist in den Prozentangaben rechnerisch berücksichtigt ("real").

Die Tabelle 7 zeigt wiederum, allerdings etwas weniger deutlich als der unter 3.3.3 beschriebene Versuch, daß anscheinend auch nach Vorinkubation in sehr hohen Antiserumkonzentrationen die Methyltransferasen nicht total inaktiviert werden.

Da die Untersuchungen gezeigt hatten, daß die Antikörper in Anwesenheit des Substrats der Enzymreaktion eine geringere Hemmwirkung entfalten, haben wir einen "Substratschutz" vermutet, wie von BUEDING (50), SEVAG (51), ZAMECNIK (52) für andere Systeme beschrieben. Diese Vermutung haben wir versucht zu verifizieren.

3.3.5 Untersuchung des Substratschutzes

Konstante Mengen Enzymprotein (360 ug) wurden mit folgenden Konzentrationen an Antiserum inkubiert:

1. 575 ug Antiserum-Protein = 1,59-facher Überschuß
2. 1150 ug Antiserum-Protein = 3,19-facher Überschuß
3. 1725 ug Antiserum-Protein = 4,79-facher Überschuß

Die Inkubation der Proben wurde wie folgt variiert:

- A) Wie im normalen Standardtest wurde in Folge pipetiert: tRNA-SAM-TMMg-Antiserum-Enzymprotein. Dann wurde für 2 h bei 37° C inkubiert und die Methylierung anschließend wie üblich bestimmt (2.5).
- B) Enzymlösung und Substrat wurden bei 0° C für 10 min. vorinkubiert. Dann wurde das Antiserum zugegeben und nochmals bei 0° C für 30 min. inkubiert. Schließlich wurden Inkubationspuffer und Co-Substrat aufpipetiert und der enzymatische Test bei 37° C gestartet. Nach 2 h entnahmen wir 100 ul aus den Proben zur Scintillationszählung (siehe 2.5).

C) Hier wurden Enzymprotein und Antiserum für 10 min. bei 0° C vorinkubiert, anschließend TMMg-Puffer, tRNA und SAM zugegeben und die Inkubation der Proben bei 37° C gestartet; Entnahme von 100 ul zur Scintillationszählung nach 2 h (2.5).

Die nachstehende Tabelle 8 zeigt deutlich, daß die tRNA einen Schutz vor Inaktivierung durch Antikörper ausüben kann. Während die Proben der Reihe B (Vorinkubation der Enzyme mit tRNA) nur eine Differenz von ± 4 % der Methylierung gegenüber der Kontrolle aufzeigen, besteht in der Reihe C (Vorinkubation von Enzym und Antiserum) ein Methylierungsverlust bis zu 21 %.

Tab. 8: tRNA-Methylierung durch Fraktion B unter Antiserumeinfluß

Probe	Methylierung in cpm	Methylierung in %
Kontrolle	5793	100
A ₁	5249	90
A ₂	5303	91
A ₃	5167	89
B ₁	6029	104
B ₂	5577	96
B ₃	5973	103
C ₁	5362	92
C ₂	5418	93
C ₃	4627	79

A, B, C: Inkubationsmodus siehe Text

Indices 1-3: Antiserumgehalt siehe Text

Vergleichen wir die Befunde aus den Reihen A, B und C dieses Versuchs miteinander, so finden wir die Ergebnisse aus den vorgenannten Untersuchungen bestätigt. Fraktion B-Antiserum hat eine hemmende Wirkung auf die Methylierung von tRNA CH₃- durch diese Fraktion. Die Hemmung ist abhängig von der Reihenfolge der Inkubation der reagierenden Partner. Nach Vorinkubation des Enzymproteins mit dem Substrat der enzymatischen Reaktion, ist der hemmende Einfluß des korrespondierenden Antiserums am geringsten, so daß man einen Substratschutz annehmen muß, dessen Mechanismus jedoch noch ungeklärt ist. Hier finden wir eine Übereinstimmung mit den Untersuchungen von ASCHHOFF (23), die zur Methode der Enzymstabilisierung mit Hefe-RNA geführt haben (siehe unter 2.2.2).

4. Diskussion

Von zahlreichen Autoren sind Präparationen methyltransferaseaktiver Proteinfractionen aus pro- und eukaryotischen Organismen beschrieben worden.

Sie methylierten entweder untermethylierte tRNA des gleichen Organismus (homologes Testsystem) oder, im Falle eukaryotischer Methyltransferasen, tRNA aus Prokaryoten (heterologes Testsystem) (15, 16 bzw. 6, 8, 12, 14).

Heterologe Substrate werden immer dann verwandt, wenn es nicht möglich ist, neben Methyltransferaseaktivitäten auch untermethylierte Substrate aus dem gleichen Organismus zu gewinnen. Dagegen kann auch im heterologen Testsystem untermethyliertes Substrat eingesetzt werden (13).

Die homo- oder heterologe Methylierung eines spezifischen Substrats betrifft stets eine oder mehrere Basen in der betreffenden tRNA-Sequenz (13).

Proteinchemisch reine tRNA-Methyltransferasen sind bisher noch nicht dargestellt worden.

Basierend auf dem für E.Coli W angewendeten Verfahren (15) haben wir aus E.Coli MRE 600 tRNA-Methyltransferaseaktivitäten angereichert und charakterisiert. Die Bestimmung der Enzymaktivität erfolgte im homologen System mit untermethylierter tRNA.

Der Präparationsweg führte über Bakterienaufschluß und Rohextrakt zu zwei Proteinfractionen A und B, die ähnlich (15) ein einheitliches und relativ methyltransferasestabiles Ausgangsmaterial für die weitere Auftrennung der Enzymaktivitäten bildeten.

Wird Fraktion A über Celluloseionenaustauscherchromatographie aufgetrennt, so ergibt sich im Gegensatz zu HURWITZ (15) eine weitaus größere Anzahl von methyltransferaseaktiven Fraktionen. Das erweckte zunächst den Anschein, als ob die Enzymaktivität gleichsam über den ganzen Elutionsbereich verschmiert sei.

Analytische Disk-Elektrophoresen des gesamten Fraktionsbereichs ergaben jedoch ein dem Gradientenverlauf entsprechend gestaffeltes Bild. Mit zunehmender Konzentration an Phosphat im Gradienten und damit steigender Ablösekonzentration der Proteinkomponenten vom Austauscher, vergrößerte sich die Wanderungsstrecke der Banden in Richtung Pufferfront.

Aus diesem Wanderungsverhalten kann unter Berücksichtigung des eingesetzten Gelsystems 1 a (24) und den Untersuchungen von REISFELD (56) geschlossen werden, daß die in Fraktion A vorhandenen Eiweißkörper neutrale bis saure Proteine darstellen.

Bei der Immunelektrophorese treten im Gegensatz zur Trennung in Polyacrylamidgelen keine nennenswerten Siebefekte auf. Die Wanderungsgeschwindigkeit der Komponenten wird bei gegebenem pH nur durch die formale Nettoladung am Molekül bestimmt (20, 21).

Immunelektrophoresen der gradienteneluierten Fraktionen zeigen die schon in der analytischen Disk-Elektrophorese beobachtete Bandenstaffelung noch viel deutlicher.

Nach diesen Ergebnissen müssen die im Anfangs-, Mittel- und Endteil des Phosphatgradienten eluierten Anteile an Methyltransferasen unterschiedliche formale Nettoladungen und damit unterschiedliche Tertiärstrukturen besitzen. Ob diese differenten Tertiärstrukturen in verschiedenen Sequenzen begründet sind oder ob es sich bei diesen Aktivitäten etwa um aktive Untereinheiten eines

Enzymkomplexes handelt, müssen künftige Untersuchungen zeigen.

Darüberhinaus wird zu klären sein, ob diese proteinchemisch differenten Methyltransferasen, wie von BJÖRK (16) und NISHIMURA (13) angegeben, auch unterschiedliche Basenspezifitäten besitzen.

Die weitere Aufreinigung einer solchen gradientgetrennten, methyltransferaseaktiven Fraktion über eine präparative Gelelektrophorese führte zu einer nur noch mit vier Komponenten verunreinigten Methyltransferaseaktivität, gleichzeitig aber auch unter den jetzigen Bedingungen zu hohen Verlusten an Enzymaktivität.

Der Einfluß von entsprechenden Antikörpern auf Methyltransferasen wurde gleichzeitig an Fraktion B untersucht. Hier zeigte sich, daß die Methyltransferaseaktivitäten von multivalentem Antiserum gegen Fraktion B gehemmt werden.

Trotz hoher Überschüsse an Antiserum war jedoch eine totale Hemmung der Enzymaktivität nicht zu erzielen, ganz gleich, ob die Methyltransferasen mit dem Antiserum vorinkubiert worden waren oder das Antiserum erst bei Start der Methylierungsreaktion zugegeben wurde.

Zwei Befunde erscheinen jedoch bemerkenswert und einer weiteren Klärung bedürftig.

Der Einfluß des Verhältnisses Substrat : Antikörper scheint für die Hemmung wesentlich bedeutender zu sein als das Verhältnis Enzymprotein zu Antikörper.

Zum anderen scheint das Substrat die Methyltransferasen vor einer Inaktivierung durch Antikörper schützen zu können. Diese Beobachtung stützt die Ergebnisse früherer Untersuchungen (23), in denen eine Stabilisierung der Methylierungsaktivität durch Zusätze von löslicher RNA gezeigt werden konnte.

Es liegt die Vermutung nahe, daß die Inaktivierung von Methyltransferasen durch korrespondierende Antikörper einem kompetitiven Mechanismus folgt, bei dem Substrat und Antikörper um die Enzyme konkurrieren.

Die bis jetzt durchgeführten Untersuchungen zu dieser Frage befinden sich jedoch noch im Stadium der Orientierung.

5. Zusammenfassung

Aktivitäten von tRNA-Methyltransferasen sind erstmalig 1962 in Extrakten von *Escherichia coli* nachgewiesen worden. HURWITZ konnte 1964 sechs enzymatisch aktive Proteinfractionen aus *E. coli* w isolieren, die unter-methylierte tRNA basenspezifisch methylierten.

Die von HURWITZ 1964 beschriebene Präparationsmethode haben wir als Grundlage für die Darstellung und Anreicherung von Methyltransferaseaktivitäten aus *Escherichia coli* MRE 600 gewählt. Aus großtechnisch gezüchteten Bakterienchargen wurden nach Aufschluß durch Hochdruckdispargierung zwei Proteinfractionen (Fraktion A und B) präpariert, die als relativ einheitliches Ausgangsmaterial für die weitere Anreicherung dienten.

Fraktion A wurde säulenchromatographisch an DEAE-Cellulose in 12 Subfraktionen zerlegt, die alle mehr oder minder Enzymaktivität aufwiesen. Die Subfraktionen wurden charakterisiert a) bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität durch Methylierung von 2 OD tRNA met⁻, b) bezüglich ihrer Komponentenzahl durch analytische PAA-Disk-Elektrophorese und Immunelektrophorese.

Subfraktion 7 wurde mittels präparativer Disk-Elektrophorese weiter aufgetrennt und in 17 Anteile zerlegt (Bezeichnung SS 0 - SS 16), von denen jedoch nur noch SS 1 und SS 2 enzymatische Aktivität besaßen.

Die Komponentenzahl von SS 2 (höchste Enzymaktivität) wurde durch "Rocket-Immunelektrophorese" nach LAURELL

und eine spezielle analytische Disk-Elektrophorese an PAA-Zylindergelen steigender Gelkonzentration bestimmt. Die lupenoptische Auswertung ergab 5 Komponenten. Eine Zuordnung der Enzymaktivität zu einer oder mehreren dieser Komponenten war nicht möglich.

An Proteinproben der Fraktion B wurde untersucht, welchen Einfluß multivalentes Fraktion B-Antiserum auf tRNA-Methyltransferasen dieser Fraktion hat. Dazu wurden verschiedene Inkubationsverfahren auf dieses Enzym-Antienzym-System angewendet.

Der gleichzeitige Ablauf von Enzym-Substrat-Reaktion und Enzym-Antikörper-Reaktion erbrachte einen Methylierungsverlust (Enzymhemmung) von ca. 50 %. Bei Bestimmung der Substratmethylierung durch Fraktion B-Proteine, die mit dem korrespondierenden Antiserum vorinkubiert waren, fanden wir eine etwas größere Enzymhemmung. Waren die Enzymproteine jedoch mit ihrem Substrat vorinkubiert worden bevor das Antiserum zugegeben wurde, so zeigte sich die geringste Enzymhemmung. Dieser als Substratschutz bezeichnete Befund bestätigt das früher bei Stabilisierungsversuchen an tRNA-Methyltransferasen beobachtete Phänomen, daß Hefe-RNA die Enzyme vor einer Inaktivierung schützt.

Die Methyltransferasen verloren auch bei hohem Antiserumüberschuß im Testansatz ihre Aktivität nie vollständig, gleichgültig, ob sie mit dem Antiserum vorinkubiert oder Enzym- und Immunreaktion gleichzeitig abgelaufen waren.

Die Enzymhemmung der Methyltransferasen beruht nach bisherigen Befunden anscheinend auf einem kompetitiven Mechanismus. Dieses Postulat bedarf jedoch noch weiterer Untersuchungen, da die bisherigen sich lediglich auf der Ebene der Orientierung bewegen.

6. Literaturverzeichnis

- 1) Kerr S.J., Borek E.
Advances in Enzymology 36, 1 , (1972)
- 2) Kerr S.J., Borek E.
Enzymic Methylation of Natural Polynucleotides
in "The Enzymes" Vol. IX, 3rd Edition, Academic
Press New York
- 3) Fleissner E., Borek E.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 48, 1199, (1962)
- 4) Kahan F.M., Hurwitz J.
J. Biol. Chem. 237, 3778, (1962)
- 5) Simon L.N., Glasky A.J.
Biochem. & Biophys. Acta 142, 99, (1967)
- 6) Burdon R.H., Martin B.T., Lal B.M.
J. Mol. Biol. 28, 357, (1967)
- 7) Baguley B.C., Staehelin M.
Biochemistry 7, 45 , (1968)
- 8) Kahle P., Hoppe-Seyler P., Kröger H.
Biochem. & Biophys. Acta 240, 384, (1971)
- 9) Srinivasan P.R., Borek E.
Proc. Nat. Acad. Sci. USA 49, 529, (1963)
- 10) Turkington R.W., Riddle M.
Cancer Res. 30, 650, (1970)
- 11) Baguley B.C., Staehelin M.
Biochemistry 8 , 257, (1969)
- 12) Baguley B.C., Wehrli W., Staehelin M.
Biochemistry 9, 1645, (1970)
- 13) Kuchino Y., Nishimura S.
Biochem. & Biophys. Res. Commun. 40, 306, (1970)
- 14) Baguley B.C., Staehelin M.
European J. Biochem. 6, 1 , (1968)
- 15) Hurwitz J., Gold M., Anders M.
J. Biol. Chem. 239, 3462, (1964)

- 16) Bjork G.R., Svensson J.
European J. Biochem. 9 , 207 , (1969)
- 17) Hurwitz J., Gold M., Anders M.
J. Biol. Chem. 239, 3474 , (1964)
- 18) Ornstein L.
Ann.N.Y.Acad.Sci. USA 121, 321, (1964)
- 19) Davis B.J.
Ann.N.Y.Acad.Sci. USA 121, 404, (1964)
- 20) Grabar P., Williams C.A.
Biochem. & Biophys. Acta (Aust.) 10, 193, (1953)
- 21) Scheidegger I.J.
Int.Arch.Allergy 7, 103, (1955)
- 22) Laurell C.B.
Analytical Biochem. 15, 45 , (1966)
- 23) Aschhoff H.J., Arnold H.H., Kersten W.,
Kersten H.
Hoppe-Seyler's Z.Physiol.Chem. 353, 1501, (1972)
- 24) Maurer H.R.
Disk-Elektrophorese, W.de Gruyter, Berlin 1968
- 25) Murphey J.B., Kies M.W.
Biochem. & Biophys. Acta 45, 382 , (1960)
- 26) Bailey J.L.
Techniques in Protein Chemistry, Elsevier
Publishing Comp., Amsterdam , 2nd Ed. 1967
- 27) Pegg A.E.
Biochem. & Biophys. Acta 232, 630, (1971)
- 28) Avital S., Elson D.
Biochem. & Biophys. Acta 179, 297, (1969)
- 29) Clausen J.
"Immunochemical Techniques for the Identification and Estimation of Macromolecules",
North-Holland Publishing Comp. 1969
- 30) Crowle A.J.
"Immunodiffusion", 2nd Ed., Acad. Press
New York & London 1973
- 31) Geyer E.
Z. Parasitenkunde 28, 352 , (1967)

- 32) Michaelis L.
Biochem. Z. 234, 139 , (1935)
- 33) Merrill D., Hartley Th.F., Claman H.N.
J. Lab. & Clin. Med. 69, 151, (1967)
- 34) Laurell C.B.
Scand. J. clin. Lab. Invest. 29 suppl. 124, 21, (1972)
- 35) Nishimura S.
Proc. Nucl. Acid. Res. II, 542, (1971)
- 36) Uriel J.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 956, (1963)
- 37) Cinader B.
Antibodies to Enzymes - A Discussion of the Mechanisms of Inhibition and Activation. In "Antibodies to Biologically Active Molecules", ed. B. Cinader. Proc. 2nd Meeting Fed. Europ. Biochem Soc., Vienna 1965, p.65. Oxford: Pergamon Press
- 38) Rajewsky K.
Enzymprotein als Antigen, Immunologische Studien an Lactatdehydrogenase. in "Immunchemie", 15. Colloqu. der Ges. für Physiol. Chem., Springer Verlag, Berlin & Heidelberg 1965
- 39) Lehmann F.G.
Biochem. & Biophys. Acta 235, 259 , (1971)
- 40) Dönnicke M., Hofer H.W., Pette D.
FEBS Letters 20, 184 , (1972)
- 41) Dönnicke M., Hofer H.W., Pette D.
FEBS Letters 20, 187 , (1972)
- 42) Arnon R., Schechter B.
Immunochemistry 3, 451, (1966)
- 43) Neuwelt E., Stumpf D., Austin J., Kohler P.
Biochem. & Biophys. Acta 236, 333 , (1971)
- 44) Pollock M.R.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 103, 989 , (1963)

- 45) Kersten H. et al.
in Vorbereitung (1974)
- 46) Branster M., Cinader B.
J. Immunol. 87, 18 , (1961)
- 47) Fazekas DE , Groth S.
Ann.N.Y.Acad.Sci. USA 103, 674, (1963)
- 48) Cinader B.
Ann.N.Y.Acad.Sci. USA 103, 495, (1963)
- 49) Marucci A.A., Mayer M.M.,
Arch. Biochem. 54, 330, (1955)
- 50) Bueding E., McKinnon J.
J. Biol. Chem. 215, 507, (1955)
- 51) Sevag H.G., Newcomb M.D., Miller R.E.
J. Immunol. 72, 1 , (1954)
- 52) Zamecnik P.C., Lipmann F.
J. Exp. Med. 85, 395 , (1947)
- 53) Pun J.Y., Lombrozo L.
Analytical Biochem. 9, 9 , (1964)
- 54) Ferris Th.G., Easterling R.E., Budd R.E.
Americ.J.Clin.Pathol. 38, 383,(1962)
- 55) Ferris Th.G., Easterling R.E., Budd R.E.
Americ.J.Clin.Pathol. 39, 193, (1963)
- 56) Williams D.E., Reisfeld R.A.
Ann. N.Y. Acad. Sci. 121, 373 ,(1964)

An dieser Stelle möchte ich meinen Dank aussprechen
Herrn Professor Dr. med. W. Kersten für die freund-
liche Überlassung des Themas;

Herrn Dr. rer.nat. Hans-Jürgen Aschnoff für die Ein-
arbeitung in Literatur und Methoden;

Frau Lydia Müller-Ali für die lebenswürdige und
aufmunternde technische Assistenz;

allen anderen Mitarbeitern des Instituts, die zu an-
regender Diskussion und konstruktiver Kritik bereit
waren;

Herrn Professor Dr. A.J. Crowle (Department of Micro-
biology, University of Colorado, Denver/USA) für die
Einarbeitung in seine Methode der zweidimensionalen
Elektroimmunodiffusion und die ausgedehnten anregen-
den Diskussionen während der Arbeit in seinem Labor
im September 1973.

Lebenslauf

20. 8.1948	Geburt in Berlin-Lichterfelde als zweiter Sohn des Assistenzarztes Dr. med. Kurt Ziemer und seiner Ehefrau Anneliese, geborene Erdmann.
1955-1961	Besuch der Grundschule in Berlin
1961-1968	Gymnasiumsbesuch des neusprachlichen Zweiges der Georg-Herwegh-Oberschule in Berlin-Hermsdorf
1. 3.1968	Abitur an diesem Gymnasium
1968-1969	Immatrikulation und dreisemestriges vorklinisches Studium an der Freien Universität Berlin
27. 3.1969	Naturwissenschaftliche Vorprüfung an der Med. Fakultät der FU Berlin
seit 1.10.69	Fortsetzung des Medizinstudiums an der Universität Erlangen/Nürnberg
21. 4.1971	Ärztliche Vorprüfung an der Med. Fak. der Universität Erlangen/Nürnberg
1. 1.1972	Beginn der Promotionsarbeiten am Institut für Physiologische Chemie der Universität Erlangen
31. 3.1974	Abschluß der experimentellen Arbeiten
20.12.1974	Medizinisches Staatsexamen an der Friedrich-Alexander-Universität in Erlangen

Copie - Center 2000

852 ERLANGEN · Obere Karlstr. 30